



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900431987
Data Deposito	31/03/1995
Data Pubblicazione	01/10/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

VACCINO PER LA PROFILASSIIMMUNITARIA DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELLA
IMMUNODEFICIENZA FELINA DEL GATTO DOMESTICO.

RM 95 A 000209

ISTITUTO SUPERIORE DELLA SANITA'

A ROMA e

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

A PISA

"Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus della immunodeficienza felina del gatto domestico."

Oggetto della presente invenzione è un vaccino immunizzante per la profilassi dell'infezione da virus della immunodeficienza felina e/o la sindrome patologica nota come AIDS felino provocata da tale virus.

Il vaccino è per uso veterinario e trova applicazione nel gatto domestico. Il vaccino induce una solida risposta immunitaria specifica diretta verso antigeni del virus come dimostrato dalla comparsa di alti titoli di anticorpi antivirali sia neutralizzanti che non neutralizzanti, dalla comparsa di risposte cellule mediate antivirali, e dalla comparsa di una robusta resistenza all'infezione provocata mediante inoculazione sperimentale con ceppi di FIV altamente virulenti. L'impiego principale del vaccino è quindi come preventivo dell'infezione in gatti non ancora infettati, ma è possibile che

eserciti un effetto benefico anche quando utilizzato come farmaco per rinforzare le risposte antivirali nei gatti già infettati, portando così al rallentamento o attenuazione nello sviluppo della patologia immunodepressiva che caratteristicamente insorge dopo una latenza più o meno lunga in questi animali.

E noto che come il virus dell'immunodeficienza umana o HIV il virus dell'immunodeficienza felina o FIV è un lentivirus, descritto per la prima volta da Niels Pedesen e collaboratori nel 1987 (Science 235,790-793 1987). Studi successivi hanno dimostrato che FIV è diffuso in tutto il mondo e rappresenta un importante problema per lo stato di salute dei gatti domestici. Il virus è infatti costantemente dimostrabile in una percentuale significativa di questi animali e in determinate condizioni epidemiologiche può raggiungere livelli di diffusione epidemici.

Virus analoghi si ritrovano in molte specie di felini selvatici. Il virus penetra usualmente per via cutanea in seguito al morso di gatti portatori o malati e va incontro ad una progressiva e rapida amplificazione negli organi linfoidi ed in altri distretti corporei. Diventa quindi facilmente

dimostrabile nel sangue periferico ed in altri liquidi corporei tra cui la saliva.

L'ospite esposto al virus tenta di reagire all'invasione con una intensa risposta immunitaria antivirale che almeno in una fase iniziale riesce ad rallentare la progressione del virus ma non riesce comunque mai a eradicarlo in quanto ormai troppo intimamente insediato in molti tipi cellulari.

I gatti infettati con questo virus sviluppano nel giro di qualche mese uno stato di immunodepressione facilmente rilevabile con lo studio dei parametri classici della funzionalità immunitaria: caduta progressiva dei linfociti T CD4+, inversione del rapporto CD4:CD8, ipergammaglobulinemia, ridotta anticorpopoiesi antigene-ridotta, ridotte risposte cellulo-mediate, ridotta produzione di linfocine, ecc, oltre ad altre manifestazioni proteiformi ancora in corso di inquadramento. A sua volta, la caduta delle difese immunitarie provocata dal virus apre la strada alla comparsa di manifestazioni neurologiche, allo sviluppo di vari tipi di neoplasie e con particolare frequenza e gravità, a superinfezioni sostenute da un'ampia gamma di agenti infettivi. Ne risultano quadri clinici estremamente complessi e polimorfi che configurano

una vera e propria sindrome (sindrome da immunodeficienza felina o FAIDS)

Per altre informazioni sul virus ed i suoi effetti patologici si possono consultare due recenti rassegne pubblicate sull'argomento: Pedersen N.C., In : J.A. Levy (ed.) The Retroviruses, vol 2, Plenum Press New York, 1993; Bendinelli M. et al., Clinical Microbiology Reviews, 8: 87-112, 1995.

Le possibilità di intervenire terapeuticamente per arrestare l'infezione da FIV sono estremamente modeste o nulle. Infatti i farmaci attualmente disponibili sono gli stessi che sono utilizzati per AIDS umano, e nel gatto infettato da FIV si sono dimostrati ancor meno efficaci di quanto lo siano nell'uomo. Per questo ed altri motivi assume grande rilievo la possibilità di prevenire l'infezione e/o la progressiva evoluzione della malattia mediante la somministrazione in via profilattica di efficaci vaccini prodotti industrialmente.

I tentativi di produrre vaccini contro FIV hanno fino ad oggi urtato contro gravi difficoltà, comuni del resto a quelle incontrate nei tentativi di sviluppare vaccini contro gli altri lentivirus ed in particolare contro HIV. Fra i problemi da risolvere il fatto che esistono vari sottotipi di FIV forniti di antigeni protettivi di superficie

diversi per cui i vaccini debbono necessariamente incorporare almeno i sottotipi prevalenti nella zona geografica in cui si prevede di utilizzarli e la mancanza di correlati studiabili in vitro che permettono di prevedere se il vaccino è veramente protettivo o meno. I vaccini anti FIV descritti a tutt'oggi o non hanno indotto livelli significativi di protezione o hanno esercitato effetti protettivi modesti o controversi. In alcuni casi hanno addirittura paradossalmente provocato un potenziamento dell'infezione sperimentale usata per sfidare gli animali immunizzati al fine di valutarne l'efficacia protettiva (Pedersen N.C. Levy (ed) The Retroviruses, vol 2. Plenum Press, New York 1993; Hosie et al. British Veterinary Journal 150:25-39 1994; Bendinelli M. et al., Clinical Microbiology Review, :87-112, 1995).

Oggetto della presente invenzione è l'allestimento di vaccini che conferiscono una solida immunità contro il virus della immunodeficienza felina e di proteggere quindi i gatti dall'acquisizione dell'infezione e/o dall'insorgenza di FAIDS.

Nella presente invenzione con il termine vaccino contro il virus della immunodeficienza felina o contro l'AIDS felino (FAIDS) si intende una preparazione costituita da una o più sottotipi del virus

della immunodeficienza felina, isolati mediante le procedure standard per linfociti o per sensibili colture linfoidi e quindi selezionati sulla base delle varie situazioni epidemiologiche esistenti in diverse aree geografiche, oppure da cellule infettate produttivamente da detti ceppi virali, oppure ancora da antigeni selezionati di detti virus. Le preparazioni vaccinanti sono trattate o sono costituite in modo da renderle completamente innocue per i gatti, pur facendo loro conservare le proprietà immunogene.

I vaccini secondo l'invenzione sono identificati dalla designazione "vaccini immunizzanti anti FIV". Una forma di tale vaccino che si dimostra molto attiva è stata sviluppata facendo crescere i ceppi virali, prescelti nelle varie situazioni epidemiologiche locali su colture di cellule feline di origine linfoide o su substrati cellulari di altra origine. Le colture infettate con idonea molteplicità sono state quindi incubate a 37° C per 6-10 giorni finché il numero delle cellule infettate che esprimono antigeni virali sulla superficie ha raggiunto livelli idonei (60/80%).

A questo punto le cellule vengono raccolte refrigerate a circa 4°, concentrate mediante centrifugazione a bassa velocità a 4° C, e sottoposte a

trattamento con glicerolo 10% per 1/5 minuti. Quest'ultimo trattamento è molto importante perché rende gli antigeni protettivi più esposti sulle superfici cellulari e quindi più immunogeni. Rimosso il glicerolo, le cellule vengono trattate con un agente disinfettante per il tempo sufficiente a portare alla inattivazione della infettività virale (ad esempio paraformaldeide 1/2% per 24 ore a 37 ° C). La sospensione cellulare viene quindi miscelata ad un uguale volume di adiuvante incompleto di Freund. Ciascuna dose di vaccino consta di circa 10 milioni di cellule infettate.

Alternativamente, vaccini anti FIV possono essere costituiti da virus extracellulare eventualmente concentrato e purificato mediante metodiche fisico chimiche e trattato in modo da distruggerne l'effetto infettante e/o patogeno oppure da molecole virali oppure da specifici frammenti selezionati di tali molecole prodotti con tecnologia del DNA ricombinante o per sintesi chimica. Anche tali materiali possono essere miscelati ad adiuvanti immunologici di vario tipo ed impiegati come vaccini anche se la loro efficacia immunizzante e protettiva è generalmente minore di quella del vaccino a base di cellule infettate sopra descritto. Un ottimo effetto immunizzante si ottiene invece

con FIV modificato in modo da fargli produrre una infezione autolimitante e che quindi non persiste nel tempo.

Sono state condotte prove per accertare l'efficacia di tali vaccini. Queste prove hanno dimostrato che i gatti vaccinati sviluppano una solida risposta immunitaria specifica diretta verso il virus come dimostrato dalla comparsa di alti titoli di anticorpi antivirali, sia neutralizzanti che non neutralizzanti, nonché dallo sviluppo di risposte cellulomediante antivirali. Inoltre, i gatti vaccinati hanno dimostrato di resistere senza infettarsi allorché cimentati con preparazioni di FIV altamente virulenti mediante inoculazione sperimentale per via parenterale.

L'impiego principale del vaccino è quindi come preventivo dell'infezione in gatti non ancora infettati, ma esistono indicazioni che esso esercita un effetto benefico anche quando utilizzato come farmaco per rinforzare le risposte antivirali nei gatti già infettati, ritardando o alleviando così lo sviluppo della patologia immunodepressiva in questi animali.

R I V E N D I C A Z I O N I

1. Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus della immunodeficienza felina del gatto domestico caratterizzato dall'essere realizzato da una preparazione costituita da uno o più sottotipo del virus dell'immunodeficienza felina isolati mediante le procedure standard per linfociti primari o per sensibili colture linfoidei e quindi selezionati sulla base delle varie situazioni epidemiologiche esistenti in diverse aree geografiche ,utilizzando cellule linfocitarie infettanti produttivamente con i ceppi virali locali e da antigeni selezionati di detti ceppi virali locali, dette preparazioni essendo costituite e trattate in modo da renderle innocue per i gatti per mantenendo le proprietà immunogene.

2. Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus dell'immunodeficienza felina secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che vengono utilizzati ceppi virali prescelti, nelle varie situazioni epidemiologiche ,locali facendoli crescere su colture di cellule linfoidei feline, o su substrati di altra origine ,incubati a temperature adatta a determinare in un periodo di tempo stabilito ,la crescita di cellule che esprimono sulla superficie livelli idonei di antigeni virali; dette cellule venendo refrigerate

,concentrate centrifugate e sottoposte a trattamento atto a renderle maggiormente immunogene,amplificando lo stimolo antigenico virale di superficie cellulare; un trattamento successivo consentendo l'inattivazione della infettività virale rendendola innocua per il felino,la preparazione di detto vaccino essendo completata dall'aggiunta dell'adiuvante di Freund.

3.Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus dell'immunodeficienza felina secondo le rivendicazioni 1 e 2 caratterizzato dal fatto che una metodica preferita per la realizzazione di tale vaccino è stata trovata essere quella di far crescere i ceppi virali prescelti su colture di cellule linfoidi feline o substrati cellulari di altra origine ;dette colture venendo opportunamente infettate;incubate a 37° C: per circa 6-10 giorni ,fino a che il 60-80 % delle cellule infettate presenta antigeni virali di superficie ;dette cellule venendo raccolte refrigerate a temperatura 4° C.e sottoposte a trattamento con glicerolo a 10% per 1-5 minuti;il glicerolo venendo rimosso e le cellule trattate ad esempio con formaldeide 1/2 per 24 ore a 37°C detta sospensione venendo quindi miscelata con uguale volume di adiuvante incompleto

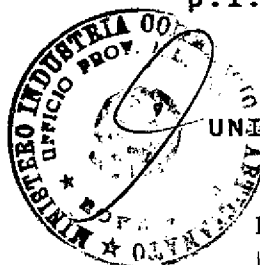
di Freund ciascuna dose di vaccino essendo costituita da circa 10 milioni di cellule infettate.

4.Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus dell'immunodeficienza felina secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto vaccino può essere costituito da virus extra cellulare eventualmente concentrato e modificato con metodiche chimico fisiche note e trattato in modo da distruggerne l'effetto infettante e/o patogeno.

5.Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione da virus della immunodeficienza felina secondo la rivendicazione 1 e 4 caratterizzato dal fatto che detto vaccino può essere costituito da molecole virali.

6 Vaccino per la profilassi immunitaria dell'infezione della immunodeficienza felina secondo la rivendicazioni 1 e 4 caratterizzato dal fatto che detto vaccino può essere costituito da specifici frammenti selezionati di molecole virali prodotti con tecnologia del DNA ricombinante o per sintesi chimica.

31 MAR. 1995



p.i. ISTITUTO SUPERIORE DELLA SANITÀ'

UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI PISA

Dr. Sneider Massimo/Studio LENZI